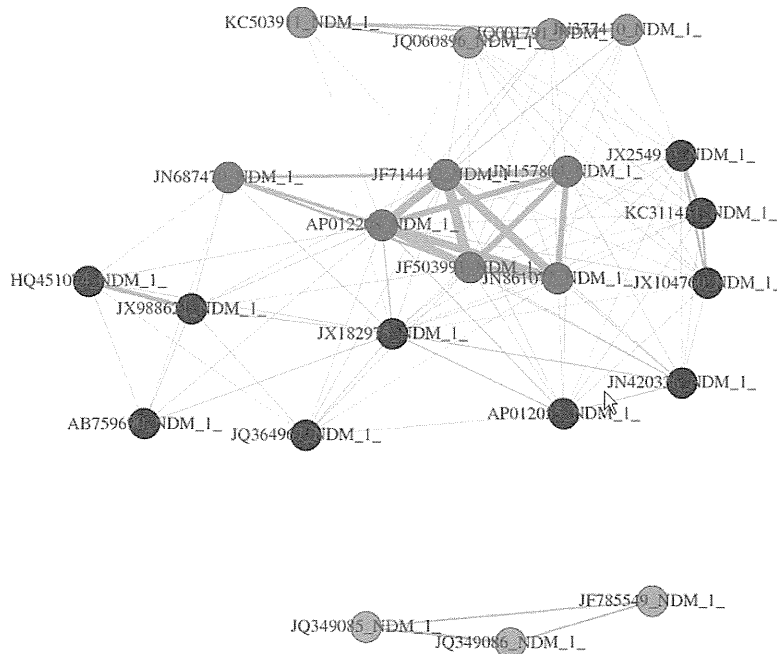


# iPAT Inter Plasmid Analyzing Tool

[download PDF version](#), [download graph data for cytoscape](#)

Identity cut off  %, Num of gene cut off  (Edges must share genes more than this number)

Group	Project	auto
<input type="checkbox"/>	1 AB759690_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	1 AP012055_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	1 HQ451074_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	1 JN420336_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	1 JQ364967_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	1 JX104760_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	1 JX182975_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	1 JX254913_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	1 JX988621_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	1 KC311431_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	2 JN377410_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	2 JQ001791_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	2 JQ060896_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	2 KC503911_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	3 JF785549_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	3 JQ349085_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input type="checkbox"/>	3 JQ349086_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	4 AP012208_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	4 JF503991_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	4 JF714412_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	4 JN157804_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	4 JN687470_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	4 JN861072_NDM_1_	<input type="text" value="auto"/>



<= It may take more than 10 min. Please be patient.

Group 1  on  off

Group 2  on  off

Group 3  on  off

Group 4  on  off

図 4 iPAT の実行結果。入力データには NDM-1 遺伝子を持つ plasmid を用いた。iPAT 解析によって、NDM-1 をもつ plasmid は 4 つ程度のグループに分類できることが示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」  
平成 25 年度分担研究報告書

分担課題名：JANIS と JVARM の連携

分担研究者	柴山恵吾	国立感染症研究所	細菌第二部
研究協力者	鈴木里和	国立感染症研究所	細菌第二部
研究協力者	濱本修一	動物医薬品検査所	検査第二部
研究協力者	川西路子	動物医薬品検査所	検査第二部
研究協力者	比企基高	動物医薬品検査所	検査第二部

### 研究要旨

わが国における薬剤耐性菌のモニタリング/サーベイランスシステムとしては農林水産省の家畜衛生分野における薬剤耐性モニタリングシステム（JVARM）と厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）事業がそれぞれ 1999 年と 2000 年より実施されている。これらの事業によって得られた耐性率を比較可能とするため、JVARM のデータを JANIS の集計プログラムで解析可能となるよう、JANIS データフォーマットに準じた JVARM データフォーマットを作成するとともに、JVARM のダミーデータを用いて集計表を仮作成した。臨床分離株と家畜由来株とで付随する疫学情報の性質は異なるが、技術的には連携したデータベースの構築が可能と思われた。

#### A. 研究目的

我が国では、農林水産省が肉牛、豚、鶏など食用動物から分離されたサルモネラ、カンピロバクター、大腸菌などの食品媒介性病原体細菌及び指標細菌の薬剤耐性モニタリング事業（JVARM）を 1999 年より開始している。一方、臨床分離株の薬剤耐性の調査としては院内感染の原因となるような薬剤耐性菌の分離状況を明らかにして、各医療機関における感染対策を支援することを目的に 2000 年より厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）事業が開始されている。現在、これらの結果は独立した形で公表されているため、直接の比較を実施しにくい。そこで、データを収集・解析するプログラムが既に整備されている JANIS 事業のシステムを JVARM にも適用し、JANIS-JVARM のデータを経時的に比較可能とする体制の整備を試みた。

#### B. 研究方法

##### 1. JVARM データフォーマットの作成

JANIS 検査部門データフォーマットを基本として、家畜由来菌の菌株情報に対応した JVARM フォーマット (Ver0.0) を作成し、臨床分離株と家畜由来株における菌株情報の相違点やデータベース構築上の問題点を明らかにした。

##### 2. JVARM ダミーデータのデータベースへの格納

JVARM においてこれまで収集されたデータを元にダミーデータ 100 件作成し、JVARM データフォーマットに変換し、データフォーマットおよび使用する菌種コード、検体コード等の問題点を明らかにした。

##### 3. ダミーデータによるアンチバイオグラム作成

上記 1. および 2. で作成した JVARM データフォーマットの JAVRM ダミーデータ 100 件を JVARM 用データベースに格納し、JANIS と同じ形式のアンチバイオグラムを作成のための集計を行った。JANIS データベース構造および集計プログラムを JVARM 用データベースに移植し、JVARM ダミーデータ格納後、アンチバイオグラムを試作し、JANIS-JVARM 比較における問題点を明らかにした。

#### C. 結果

##### 1. JVARM データフォーマット (Ver0.0) の作成

JANIS データフォーマットと JVARM データフォーマット (Ver0.0) の対応を表 1 に示す。

家畜由来株と病院で分離される臨床株では含まれる疫学情報が異なっているため、

必須とすべき情報項目に差異があった。

JANIS では任意であるが、JVARM において必須とすることが必要な情報として、調査対象（由来）と調査目的が挙げられた。JANIS は病院分離株に限定しているが、JVARM では農場を調査対象としており、今後、屠場等の施設を追加することを予定している。これに対応するため、現在 JANIS では使用していない項目 No. 1 を用いて区別することとした。また、JANIS での提出検体は診療もしくは感染対策に必要な検体に限定され、かつ、検査目的が厳密に区別されにくく、それによって検体と分離菌株の内容に大きな差異無いと考えられることから、現在検査目的の調査を行っていない。一方 JVARM では異なる目的（モニタリング、野外流行株検査等）で収集された検体由来の菌株が含まれ、かつ、目的によっては検体や分離株の傾向が大きく異なる可能性があることから、検査目的について収集する必要があると考えられた。従って、調査対象と同様に、現時 JANIS では使用していない項目 No. 8(調査目的) を必須とした。これによって、将来 JVARM (家畜由来株) データが集積された際、調査対象（農場、屠場といった由来）別および、調査事業別の集計が可能となると思われる。

JVARM データにおいて、畜種（牛、豚等）は重要な項目であり、データ集積後は畜種別の集計が必要と思われる。しかし JANIS データフォーマット上は対応する項目が無いので、患者 ID 用の項目を利用することとした。具体的には、JANIS で 15 桁で自由に設定できるようになっている患者 ID を、JVARM では、最初の 2 桁を畜種によって固定し、残りの 13 桁を耳標番号等の個体識別番号を入力することで対応することとした。

一方、JANIS では必須/推奨項目であり集計時重要な項目であっても、JVARM では任意もしくは入力規則の変更を必要とした項目として、検体提出日、診療科、病棟、がある。JANIS において、検体提出日は検体の固有性を確認するためのキー項目の 1 つであり、年月日までの入力を必須としている。病院での検査実施上も検体提出日は重要な情報で

あるため、必須項目とすることに問題は無い。一方、JVARM では、検体提出日（検体採取日）の日付については必ずしも充足されている情報では無く、「年」までの情報のみ得られる場合も考えられた。そのため、月、日の情報が得られない場合は 1 月 1 日と入力し、集計時の運用で対応することとした。また、診療科や病棟については JVARM では対応する情報がほとんど無いと考えられた。

そのほか、採取場所を特定するための位置情報として、JANIS の医療機関コード（5 桁）を採材場所とした。医療機関コードの最初の 2 桁は都道府県コードであるため、JVARM でも同様に最初の 2 桁を都道府県コードとし、残りの 3 桁で農場、屠場などの個別コードとした。また、JANIS で性別は男女のみであるが、JVARM では雄、雌、のほか去勢、避妊、不明も含め、JANIS での入院/外来に対応する項目として JVARM では健康家畜/病畜とした。

JANIS/JVARM ともに任意項目としたものは感染症データおよび抗菌薬データである。JANIS では事業開始当初、検体を採取した患者の感染症データや抗菌薬投与歴についての調査も検討したが、実用性が低いとの結論になり現在は使用されていない。JVARM では調査目的の検体収集の場合、これらのデータを入力できる可能性がある。今後これらの項目をどのように使用するかを検討することとした。

菌株情報（菌種や抗菌薬感受性試験結果）については JANIS/ JVARM ともにほぼ同じフォーマットで入力が可能と考えられた。

## 2. JVARM ダミーデータのデータベースへの格納

1. で作成した JVARM データフォーマット (Ver0.0) は固定長のテキストファイルである。一方、JVARM データは現在エクセル形式で管理されている。将来、これまでに蓄積された JVARM データを作成したデータフォーマットに変換できるエクセルの VBA を用いた変換ツールを作成した (図 1)。将来的には、JVARM データフォーマットを作成できるソフトウェアの作成が必要と思われるが、ソフトウェアの作成は費用と時間がかかり、また変更が生じた際の改修にも同じく時間と費用を要するた

め、データフォーマットが確定するまでの間は柔軟な対応が可能な本ツールでのデータ変換を行う事とした。

本年度作成したダミーデータ 100 件の移行した際、あらたに確認された問題として、抗菌薬コードに動物用抗菌薬が含まれていないことが挙げられた。JANIS 抗菌薬コードには現在使用されていないコードはあるが、新薬が市場に導入された場合コードを新たにふる必要があるため、これらのコードをそのまま当てはめることは将来的に問題が発生すると思われる。抗菌薬コードについては、来年度の検討課題とした。

### 3. ダミーデータによるアンチバイオグラム作成

JVARM データフォーマットに変換されたダミーデータ 100 件を用いたアンチバイオグラムを試作した(図 3)。JANIS では医療機関から報告された MIC 値を元に CLSI2007 のブレイクポイントを用いて耐性/感性の判定をしている。判定された耐性/感性の割合を抗菌薬ごとに示しているものがアンチバイオグラムであり、各菌種の抗菌薬の感受性パターンを視覚的把握するのに有用である。一方、今後データに加わる予定の動物用抗菌薬には CLSI に判定基準が存在しない成分があるため、抗菌薬の系統を元に CLSI の基準と同等のものを新たに設定する必要がある事が明らかとなった。

#### D. 考察

JANIS-JVARM データの連携において、技術的に解決すべき課題として、菌株に付随する疫学(臨床)情報のデータの質の違いが考えられる。今回実際に JANIS データフォーマットと対応させる形式での JVARM データフォーマットを作成する中で、具体的に個々の内容について検討した。多くの項目については、各項目に JVARM 用のコードを割り振ることで対応可能と考えられる。しかし、抗菌薬コードについては、JANIS-JVARM で共通のものを使用する必要がある一方で、動物用抗菌薬など、JANIS では設定する必要の無い薬剤もあるため、今後どのように対応するかを検討する必要がある。

また、ヒト臨床株と家畜由来株の薬剤耐

性率の比較する上で、同一の抗菌薬でなくても同じ機序で耐性となる抗菌薬の系統として比較する必要があると考えられた。さらに、動物用抗菌薬の薬剤耐性の判定は CLSI などには記載がないものが多く、こんどどのように集計していくかについての検討が必要と思われた。

JANIS のデータは、本来診療上必要なため実施された細菌検査であり、薬剤耐性菌分離率の調査目的で収集されたデータでは無い。そのため、同一患者から複数回、同一または異なる検体を採取することがあり、耐性率を算出する場合には重複検体の処理が重要となる。また、測定抗菌薬や測定範囲についても医療機関によって差異がある。その反面、既存データを収集しているため既に膨大なデータが蓄積されており、薬剤感受性の測定形式が統一されていなくても、菌種別、地域別の様々な抗菌薬の薬剤耐性率の年次推移に関する一通りのデータが得られる。一方、JVARM は調査研究として収集されているデータであり、菌株も同時に収集されている。そのため測定抗菌薬の種類や測定幅が統一されており、精度の高いデータが集積されている。反面、JANIS に比較してデータ件数が少なく、菌種別や畜種別に細分化した場合個々の集計項目の菌株数が少なくなる可能性がある。

今後は既に蓄積された JVARM の実データを、今年度構築したデータベースに格納、集計することで、今年度明らかになった問題点をより詳細に検討し、集計方法や菌コード、JVARM データフォーマット Ver1.0 の確立を進めることにより、効率的な JANIS-JVARM 比較体制の確立を目指す。

#### E. 結論

JANIS-JVARM を連携させるための基本的な検討を実施した。技術的な問題点について明らかになったが、いずれも今後の検討によって対応可能と考えられた。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

表 1

No	JANIS必須/推奨	JANIS項目名	JVARM必要項目(案)	No	JVARM項目名	属性	項目長	開始位置	JVARMの仕様	
1		調査対象	①	◎	1	由来	数字	1	1	1:農場、2:屠場、3:その他
2	◎	医療機関		◎	2	採材場所	数字	5	2	最初の2桁:全国地方公共団体コードの都道府県コード、残り3桁:任意のコード(別農場は別番号とすること)
3	◎	ID		◎	3	畜種(及び個体番号)	英数字	15	7	最初の2桁:畜種(01:牛、02:豚、03:肉用鶏、04:採卵鶏、08:その他)、残り13桁:耳標番号等個体識別番号を記載
5	○	性別		○	4	性別	英字	1	22	M:雄、F:雌、E:去勢、C:避妊、U:不明
7	◎	入院外来		◎	5	個体の健康状態	数字	1	23	1:健康、2:病畜、3:その他
8	○	診療科			6	診療科	数字	3	24	JANIS別紙資料「診療科コード」参照
9	○	病棟			7	病棟	英数字	15	27	自由入力(英数字のみ)
10		検査の目的		◎	8	調査の目的	数字	1	42	1:モニターリング、2:野外流行株検査、6:その他
11		感染症名			9	感染症名	英数字/ハイフン	9	43	JANIS別紙資料「疾病分類コード」参照(動物固有の疾病、感染症以外の飼料添加物、予防的投与を追加)
17		抗菌薬投与の有無		②	○	10	抗菌薬投与の有無	数字	1	52
18		(1)抗菌薬名	○		11	(1)抗菌剤名	数字	4	53	JANIS別紙資料「抗菌薬コード」に動物薬を追加(飼料添加剤も)
19		(1)抗菌薬の1日投与量	○		12	(1)抗菌剤の投与量(給与量)	数字/ピリオド	7	57	□□□□.□□(小数点位置固定)
20		(1)抗菌薬の投与量単位	○		13	(1)抗菌剤の投与量単位	数字	1	64	1:ml、2:g/力価/t、3:ml/kg、4:mg/kg、5:ml/羽
21		(1)投与日数	○		14	(1)おおよその投与日数	数字	2	65	日
22		(1)投与方法	○		15	(1)投与方法	数字	1	67	1:静注、2:筋注、3:経口、4:飲水、5:飼料添加、6:皮下、7:乳房注入、8:その他、9:不明
23		(2)抗菌薬～(20)抗菌薬	○		16	(2)抗菌剤～(20)抗菌剤		285	68	
145	◎	検査材料名	◎		111	検査材料名	数字	3	353	JANIS別紙資料「検査材料コード」参照。ただし屠場の場合は同一農場由来の検体をプールして、そこから分離する場合
146	◎	検体提出日(受付日)	○		112	採材日	〃	8	356	YYYYMMDD(西暦年月日)
147	○	検体採取日	○		113	検査開始日	数字	8	364	YYYYMMDD(西暦年月日)
161	○	培養結果	◎	114	培養結果	1、スペース	1	372	1:陰性、陽性の場合は半角スペース	
162	(◎)	A菌名	③	(◎)	115	A菌名	数字	4	373	JANIS別紙資料「菌名コード」参照(動物固有の菌種を追加する必要あり)
166	(◎)	B菌		(◎)	116	B菌名	数字	4	377	A菌に同じ
170	(◎)	C菌		(◎)	117	C菌名	数字	4	381	A菌に同じ
174	(◎)	D菌		(◎)	118	D菌名	数字	4	385	A菌に同じ
178	(◎)	E菌		(◎)	119	E菌名	数字	4	389	A菌に同じ
182	(◎)	A-1薬剤名		(◎)	120	A-1薬剤名	数字	4	393	JANIS別紙資料「抗菌薬コード」参照(動物用医薬品のみの抗菌剤は追加する必要あり。飼料添加剤も)
183	(◎)	A-1検査方法		(◎)	121	A-1検査方法	数字	2	397	JANIS別紙資料「薬剤感受性検査測定法コード」参照。
184	(◎)	A-1仕切法		(◎)	122	A-1仕切法	数字	1	399	1:<(より小)、2:>(より大)、3:<=(より小さい又は等しい)、4:>=(より大きい又は等しい)、=(等しい)は半角スペース
185	(◎)	A-1MIC		(◎)	123	A-1MIC	数字/ピリオド	5	400	□□□□□整数(右寄せ)または□.□□□□(小数点位置固定)
186	(○)	A-1阻止円径		(○)	124	A-1阻止円径	数字	2	405	整数(mm)
187	(◎)	A-1判定(SIR)	(◎)	125	A-1判定(SIR)(ブレイクポイントはJVARMのブレイクポイント)	英字	1	407	S 又は I 又は R	
189	(◎)	A-2からA-30	(◎)	126	A-2からA-30		435	408		
392	(◎)	B	(◎)	300	B		450	843	A菌に同じ(ない場合は半角スペース)	
602	(◎)	C	(◎)	480	C		450	1293	A菌に同じ(ない場合は半角スペース)	
812	(◎)	D	(◎)	660	D		450	1743	A菌に同じ(ない場合は半角スペース)	
1022	(◎)	E	(◎)	840	E		450	2193	A菌に同じ(ない場合は半角スペース)	
1236		検体番号付加フラグ1		1020	検体番号付加フラグ1		1	2643	“(”固定)	
1237	◎	検体番号	◎	1021	検体番号	英数字/ハイフン	15	2644	各機関内でユニークな番号をつける。家畜の個体識別番号でも可。	
1238		検体番号付加フラグ2		1022	検体番号付加フラグ2		1	2659	“(”固定)	
1239		共通利用予備領域		1023	共通利用予備領域	スペース	22	2660	本システムバージョンアップ用	
1240	◎	バージョン情報	◎	1024	バージョン情報	英数字/ピリオド	4	2682	「JANIS検査部門提出データの概要」を参照	
1241		各医療機関利用領域		1025	各検査機関利用領域		50	2686	各検査機関が独自に使用可能	

図 1  
 エクセル→JVARM データフォーマット変換ツール

データフォーマット表のdata1～data10の列に値を入力し、データ作成ボタンを押すと、表上のdata1～data10に指定用形式のコードが作成されます。

データ作成 Status 2013/11/28 14:52:06 終了

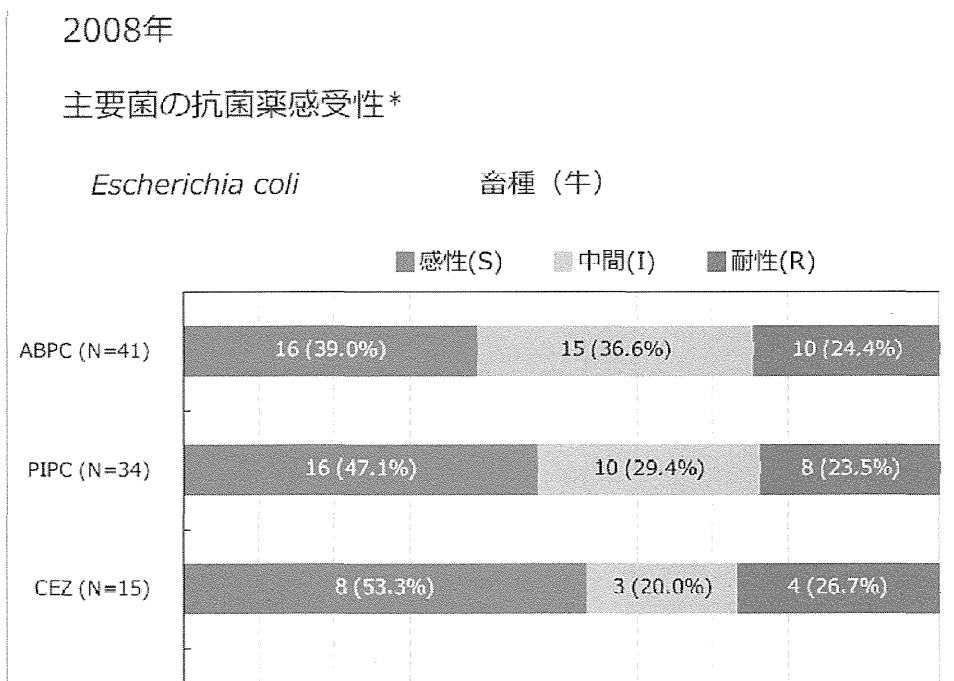
! JVARM形式のコードとして、表の他にここに反映されます。

data1	19900101000000000001
data2	
data3	
data4	
data5	
data6	
data7	
data8	
data9	
data10	

! 各値設定箇所(1,1,値を指定し、OK)です。

必須/任意	Min	JVARM項目名	data1	data2	data3	data4	data5	data6	data7
◎	1	出来	1						
◎	2	採材場所	99001						
◎	3	菌株(及びATCC原株番号)	01000000000001						
○	4	性別							
◎	5	個体の感染状態	1						
○	6	診療科							
○	7	菌株							
◎	8	調査の目的	1						
○	9	感染症名							
○	10	抗菌薬投与の有無							
○	11	(1)抗菌薬							
○	12	(1)抗菌剤の投与量(給与量)							
○	13	(1)抗菌剤の投与量単位							
○	14	(1)抗菌剤の投与日数							
○	15	(1)投与方法							
○	16	(2)抗菌剤							
○	17	(2)抗菌剤の投与量(給与量)							

図 2  
 JANIS 集計プログラムと JVARM ダミーデータを用いて作成したアンチバイオグラム



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

- ・ 食肉の多剤耐性菌（VRE, ESBL 生産菌など）の調査・研究

研究分担者 富田 治芳 （群馬大学大学院医学系研究科細菌学分野）  
研究協力者 谷本 弘一 （群馬大学大学院医学系研究科薬剤耐性菌実験施設）

研究要旨.

環境（家畜、食肉）からヒトへの伝播・拡散が危惧される多剤耐性腸内細菌科菌（ESBL 生産菌、AmpC 生産菌）およびバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）について国内の食肉検体を調査し、検出・分離された耐性菌の解析を行った。2011 年度と 2012 年度に収集した国内産食肉 271 検体（鶏肉 180、豚肉 91）、輸入食肉 358 検体（鶏肉 157、豚肉 201）の合計 629 検体を調査した結果、ESBL 生産菌は 57 検体陽性(9.1%)、AmpC 生産菌は 39 検体陽性(6.2%)であった。ESBL 生産菌は鶏肉から高頻度で検出され（国内産 20.0%、ブラジル産 21.5%）、AmpC 生産菌の検出率は国内産(9.2%)、輸入食肉(3.9%)であった。遺伝子型の解析から ESBL 生産菌は CTX-M 型が多く、国内産は CTX-M-1、輸入食肉は CTX-M-2、CTX-M-8/25 が主に分離された。食肉由来株の各遺伝子型の分離頻度は臨床分離 ESBL 生産株とは異なっていた。VRE については、以前の 2009 年の調査において国内産（宮崎）鶏肉 8 検体から分離した未知の遺伝子型 VRE19 株が、全て新規 VanN 型 VRE であることを確認した。PFGE 解析から 8 検体のうち 6 検体から得た VRE 株は 2011 年に宮崎県産鶏肉 1 検体から分離した VanN 型 VRE 株と同一クローンであったが、他の 2 検体由来の株は異なっていた。MLST 解析から、それら遺伝型の異なる VRE 株は 2008 年にフランスの患者から分離した世界最初の VanN 型 VRE 株と遺伝的に近縁の株であることが明らかとなった。

A. 研究目的

1) 臨床では多剤耐性の腸内細菌科菌（大腸菌、肺炎桿菌など）が急激に増加している。特に抗菌薬として最も多く使用されている  $\beta$ -ラクタム剤に対して高度耐性を示す ESBL 生産菌、および AmpC 生産菌の増加が深刻な問題となっている。これら多剤耐性腸内細菌科菌は環境（家畜）から畜産物、特に食肉を介してヒトへ伝播、拡散する危険性が指摘されている。本研究では食肉のこれら多剤耐性腸内細菌科菌の調査・解析を行い、その関連性を科学的に明確にすることを目的とした。

2) 多剤耐性のバンコマイシン耐性腸球菌 VRE は欧米で院内感染症の主な起原菌として深刻な問題となっている。ヨーロ

ッパにおいては過去の家畜への肥育目的の抗菌薬（アボパルシン）使用による環境中での VRE の増加とそのヒトへの伝播、拡散が指摘されている。幸い日本国内では VRE の分離頻度は欧米に比較し低いが、近年、増加中であり複数件のアウトブレイクが臨床報告されている。しかし国内ではこれまで VRE に関する耐性機構の解析、伝播・拡散機構の解明、分子疫学研究は十分に行われていない。本研究では環境（家畜、食肉）由来 VRE と臨床分離 VRE との関係を明らかにする目的で、国内食肉における VRE の調査と解析を行った。

B. 研究方法

食肉検体：国内産食肉は群馬県食肉衛生

検査所、宮崎県産都城食肉衛生検査所、鹿児島県串木野食肉衛生検査所の3ヶ所からそれぞれ、各年度鶏肉30検体、豚肉15検体を収集した。海外食肉は各年度に横浜検疫所、神戸検疫所で取り扱う輸入食肉（海外からの鶏肉120検体、豚肉120検体）を収集した。各施設から送付された検体は速やかに凍結保存とし、順次融解の後、解析を行った。

検出方法：

1) ESBL生産菌およびAmpC生産菌(腸内細菌科菌)の検出

国内の食肉衛生検査所で採集された肉の拭き取り材料を用いた。輸入肉はミンチ肉を用いた。それぞれをLB液体培地3mlで一晩培養し、0.1mlをDHL寒天培地

(ABPC 20 mg/L)に塗布した。発育コロニーを2個ずつ釣菌し、純培養後チトクロム・オキシダーゼ試験陰性菌のみを選択した。CTX、CAZに対するMIC値2mg/L以上の株についてさらに2薬剤阻害実験を行った。ESBL生産確認のためにCTX、CAV、CAZディスク、AmpC生産確認のためにCTX、ボロン酸、CAZディスクをそれぞれ用いたディスク拡散法を行った。各々の耐性遺伝子型(ESBL; TEM, SHV, CTX-M, およびAmpC; MOX, CIT, DHA, ACC, EBM, FOX)の確認には各種特異的プライマーを用いたPCR法を用いた。本研究での検出方法のサマリーを図1に示す。

2) VREの検出

培地；腸球菌分離にはEnterococcosel Broth (BBL)、Bile esculin azide agar (Difco) およびBrain Heart Infusion agar (Difco)を使用。

用いた薬剤；バンコマイシン(VCM)、テイコプラニン(TEIC)

腸球菌の分離；VRE検出のための選択的方法を用いた。検体のガーゼのふき取りサンプル、ミンチ肉片を、VCM6.0 µg/ml加Enterococcosel Brothで48時間選択的増菌後、VCM12.5 µg/ml加Bile esculin azide agar選択培地に塗布し、得られたコロニーをVCM6.0 µg/ml加Brain Heart Infusion agar上で単集落分離を行うことにより選

択した。ミンチ肉浸潤液0.1mlをVRE選択寒天培地に塗布した。選択用寒天平板の培養時間はすべて37°C、48時間培養。薬剤耐性検査は薬剤平板希釈法を用い、接種菌液は1夜液体培地培養後の菌を100倍希釈することにより用いた。VREの検出にはvanA, vanB, vanC1, vanC2/3, vanN, 各種ddlの特異的プライマーを用いたマルチプレックスPCR法を用いた。必要に応じてDNAシーケンス解析(Big Dye primer法)、PFGE解析、MLST解析を行った。

倫理面への配慮 全ての臨床分離株は患者個人を同定できる情報を含まない検体として収集し、本研究に用いた。

C. 研究結果

1) ESBL生産菌およびAmpC生産菌の調査・検出のために2011年、2012年度の二年間に収集した国内産食肉271検体(鶏肉180、豚肉91)、輸入食肉358検体(鶏肉157、豚肉201)の合計629検体を用いた。その内訳を表1(国内産食肉)および表2(輸入食肉)に示す。食肉検体全体での検出頻度はESBL生産菌57検体陽性(9.1%)、AmpC生産菌39検体陽性(6.2%)であった。国内産食肉と輸入食肉との比較ではどちらの耐性菌も国内食肉からの検出率の方が高かった(図2)。ESBL生産菌は鶏肉から高頻度で検出され(国内産20.0%、ブラジル産21.5%)、AmpC生産菌の検出率は国内産(9.2%)、輸入食肉(3.9%)であった。国内産食肉由来ESBL生産菌および輸入食肉由来ESBL生産菌の検出結果の詳細を表3、および表4に示す。また同様にAmpC生産菌の検出結果は表5(国内産食肉)および表6(輸入食肉)に示す。菌種としては*Escherichia. coli*が最多であり、次いで*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*が多く分離された(図3)。遺伝子型の解析からESBL生産菌はCTX-M型が多く、国内産はCTX-M-1、輸入食肉はCTX-M-2, CTX-M-8/25が主に分離された。食肉由来株の各耐性遺伝子型の分離頻度は臨床分離ESBL生産株の遺伝子型とは異なる



っていた (図 4)。

2) 2009 年に収集解析した食肉 9 検体から未知の遺伝子型 VRE (*E. faecium*) 合計 19 株を分離した (表 7)。8 検体は全て国内産鶏肉 (宮崎県産) であった。解析の結果、全ての株は 2011 年に私達が宮崎県産鶏肉から分離し、世界で 2 例目として報告した VanN 型 VRE (*E. faecium* GU121-1) と同一型 VRE 株であった (図 5)。19 株の VanN 型 VRE を PFGE 解析した結果、これらは 6 検体 14 株と 2 検体 5 株の全く異なる 2 つのパターンに分かれた (図 6)。6 検体 14 株の VRE は 2011 年分離の VanN 型 VRE 株と同一の PFGE パターンを示したことから由来が同じクローンと考えられた。他の異なるパターンを示す 2 検体 5 株のうち代表株 (*E. faecium* AA-22) を 1 つ選び、MLST 解析を行った。その結果、この株は 2011 年分離の GU121-1 株の ST669 とは全く異なる新規の ST 型 (ST862) であった。ST669 は ST240 と *atpA* 遺伝子配列が 1 塩基異なるのみの *E. faecium* 株でこれらは極めて近縁の遺伝子型を持つことが明らかとなった (表 8)。ST240 は世界で初めて分離された VanN 型 VRE (*E. faecium* UCN71) 株である (図 7、表 8)。ST240 と ST862 は ST669 同様、ヒトや家畜において拡がっている主なクローン株とは異なる別の遺伝子型 *E. faecium* 株であった (図 7)。

#### D. 考察

食肉検体から ESBL 生産、および AmpC 生産各種腸内細菌科菌を検出した。検出頻度は他の報告とは異なり (時には 80% 以上の検出率)、それぞれ全体で 10% 程度と高くなかった。その原因として、検体を LB 液体培地で前培養する際に、薬剤を入れずに単純な増菌操作のみをしたことが挙げられる。食肉検体に検出目的以外の他の菌の付着が多い場合、あるいは検出菌の付着が極めて少ない場合、増菌処理後であっても目的とする菌が検出限界以下になることが考えられる。また食肉収集の過程で凍結溶解が繰り返されるため、また検体収集から検査までの時間経過中に付着菌の大部分が死

滅減少してしまったことも予想される。他の報告の多くが食肉小売店から購入し収集した検体である。そのため小売店での食肉処理中の環境菌の付着、他の食肉から器具を介した汚染も否定できない。今回私達が収集した検体は小売店に流通する以前の段階の食肉であった。それらの違いによって見かけ上、検出頻度に大きな差を認めた可能性も考えられた。今後、これらを踏まえた調査方法、特に検出方法の検討、あるいは検出限界値を高める改善が必要であろう。

VanN 型 VRE (*E. faecium*) は 2011 年にフランスの臨床株として初めて報告された新規の Van 型 VRE である (図 5、図 7)。今回、日本の環境中 (複数の食肉検体) から同一型 VRE を分離した。レトロスペクティブな解析の結果、VanN 型 VRE は 2009 年に収集された食肉検体に既に存在しており、その一部の株において宿主の遺伝型がフランスの臨床分離株と極めて類似しており遺伝的な関連性を認めた。これらの結果は、新規 VanN 型 VRE は既に環境中に拡散していることを示唆しており、同時に VRE において環境からヒトへの伝播・拡散の可能性を強く示すものと考えられた。

#### E. 結論

国内の食肉から ESBL 生産および AmpC 生産腸内細菌科菌を分離した。分離頻度は国内産の食肉、特に鶏肉から比較的多く分離された。ESBL 生産菌における各耐性遺伝子型の分離頻度は臨床分離株のものとは異なっていた。

新規 VanN 型 VRE 株を国内産食肉から複数分離した。一部の株はフランスの臨床株と類似の遺伝背景を持ち、臨床株と環境株との関連性が強く疑われた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nomura T, Tanimoto K, Shibayama K, Arakawa Y, Fujimoto S, Ike Y, Tomita H. Identification of VanN-type vancomycin resistance in an *Enterococcus faecium* isolate from

chicken meat in Japan.  
Antimicrobial Agents Chemotherapy.  
2012; 56:6389-6392.

- 2) Tsutsumi Y, Tomita H, Tanimoto K. Identification of novel genes responsible for overexpression of *ampC* in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2013; 57:5987-5993.
- 3) Kurushima J, Hayashi I, Sugai M, Tomita H. Bacteriocin protein BacL1 of *Enterococcus faecalis* is a peptidoglycan D-isoglutamyl-L-lysine endopeptidase. Journal of Biological Chemistry. 2013; 288:36915-36925.
- 4) Hirakawa H, Tomita H. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. Frontiers Microbiology. 2013; 4: 114.

## 2. 学会発表

- 1) 野村隆浩、柴山恵吾、荒川宜親、池康嘉、富田治芳. VanN型バンコマイシン耐性腸球菌の解析. 第86回日本細菌学会総会. 2013年3月20日 千葉.
- 2) 菅貴則、谷本弘一、富田治芳. 食肉から分離されたESBL産生腸内細菌科菌について. 第42回薬剤耐性菌研究会. 2013年10月17日 静岡.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他